UNIWERSYTET WARSZAWSKI

Wydział Biologii
INSTYTUT MIKROBIOLOGII
ZAKŁAD GENETYKI BAKTERII
prof. dr hab. Dariusz Bartosik
bartosik@biol.uw.edu.pl
tel. 22 55 41 318

Warszawa, 05.02.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdy Furmaniak pt.

„*Jadalne cyjanobakterie z rodzaju Arthrospira – genetyka, fizjologia i bezpieczeństwo stosowania jako produkt pochodzenia naturalnego*",

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem dr. hab. Krzysztofa Walerona

Cyjanobakterie stanowią jedną z najliczniejszych i najważniejszych, pod względem ekologicznym, grup mikroorganizmów występujących w biosferze naszej planety. Odegrały one kluczową rolę w ewolucji życia na Ziemi, zaopatrując atmosferę i wody morskie w tlen, a poprzez nawiązanie relacji symbiotycznych z komórkami innych organizmów stały się prekursorem plastydów komórek roślinnych. Cyjanobakterie znajdują również liczne zastosowania – m.in. w biotechnologii środowiskowej, przy tworzeniu sztucznych modelowych ekosystemów, oraz w przemyśle – spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym. Mimo, iż mikroorganizmy te stanowią bardzo ciekawy i nośny pod względem naukowym obiekt badawczy, to jednak wciąż stosunkowo niewiele o nich wiemy. Dość fragmentaryczna jest m.in. wiedza o strukturze i stopniu zróżnicowania ich genomów, mechanizmach regulacji ekspresji genów, czy też o molekularnym podłożu przebiegu wielu procesów metabolicznych. Wynika to, w dużej mierze, z trudności prowadzenia hodowli tych bakterii w warunkach laboratoryjnych, niewielkiej liczby odpowiednich narzędzi i markerów genetycznych oraz braku uniwersalnych i wydajnych metod wprowadzania do ich komórek egzogennego DNA.

Autorka ocenianej rozprawy podjęła się zatem niełatwego zadania, wybierając jako organizmy modelowe w swoich badaniach cyjanobakterie z rodzaju taksonomicznego *Arthrospira*, który grupuje szczepy występujące w alkalicznych wodach regionów tropikalnych i subtropikalnych. Główne założenia rozprawy zakładały: (i) przeprowadzenie analiz genomicznych kilku szczepów *Arthrospira* spp., (ii) identyfikację, charakterystykę i zbadanie rozpowszechnienia wybranych grup genów w genomach tych bakterii, a także (iii) zbadanie jakości i określenie czystości mikrobiologicznej dostępnych komercyjnie suplementów diety zawierających suchą biomasę komórek *Arthrospira* spp. Biorąc pod uwagę niewielką ilość dostępnych danych na temat *Arthrospira* spp. oraz możliwość wykorzystania tych bakterii w praktyce, uważam, że podjęcie tej tematyki przez Doktorantkę było w pełni zasadne.

Rozprawa doktorska zawiera 190 numerowanych stron wydruku. Została ona podzielona na rozdziały o układzie typowym dla prac doświadczalnych, obejmującym: cele pracy, streszczenie (również w języku angielskim), wstęp, materiały, metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski końcowe oraz bibliografię. W rozprawie zamieszono także wykaz stosowanych skrótów oraz 5 załączników, zawierających dane będące uzupełnieniem bądź rozwinięciem części eksperymentalnej. W głównej części pracy zamieszczono sumarycznie 23 tabele, 10 rycin, 15 schematów, 5 fotografii oraz 2 wykresy.

Ocena poszczególnych części pracy

W mojej opinii, **tytuł rozprawy** "*Jadalne cyjanobakterie z rodzaju Arthrospira – genetyka, fizjologia i bezpieczeństwo stosowania jako produkt pochodzenia naturalnego*" nie jest poprawnie sformułowany od strony językowej. Ponadto, poprzez wprowadzenie bardzo ogólnych pojęć "genetyka" i "fizjologia", czytelnik nie uzyskuje informacji, co jest istotą opisywanych badań, a przecież jednym z głównych wątków tej pracy jest analiza systemów restrykcji i modyfikacji oraz systemów CRISPR-Cas. Wydaje mi się, że przedstawiony tytuł rozprawy byłby bardziej odpowiedni dla pracy przeglądowej na temat bakterii *Arthrospira* spp.

Przedstawione w rozprawie **Cele Pracy** (jest ich aż 7) to w zasadzie sprecyzowane zadania badawcze, ukazujące jedynie zakres przeprowadzonych prac. Zamieszczenie ich na samym początku pracy nie jest typowe. Osobiście wolę, gdy cel – ujęty jako cel naukowy, przedstawiający zarysowany problem badawczy – jednoznacznie wynika z dobrze poprowadzonego Wstępu, na którego tle łatwiej można ocenić zasadność podjętych badań.

Wstęp pracy obejmuje 29 stron i składa się z 6 głównych rozdziałów. Pierwszy z nich stanowi kompendium wiedzy na temat bakterii z rodzaju *Arthrospira* spp. Po krótkim ogólnym wprowadzeniu, Autorka charakteryzuje te bakterie przez pryzmat wyników badań z zakresu genomiki, transkryptomiki i filogenetyki, omawia także rozpowszechnienie tych mikroorganizmów w naturze oraz ich zastosowania w biotechnologii i przemyśle. Drugi rozdział przynosi ogólne informacje na temat bakteryjnych systemów restrykcji-modyfikacji (R-M) oraz CRIPSR-Cas, których aktywność skierowana jest wobec egzogennego DNA. Kolejny rozdział opisuje zagadnienia związane z praktycznym wykorzystaniem bakterii *Arthrospira* spp. jako suplementu diety, a w trzech ostatnich przedstawiono krótką charakterystykę, kolejno, probiotyków, bakterii z rodzaju *Bacillus* oraz bakterii z rodzaju *Halomonas*.

Układ tematyczny Wstępu jest z zasadzie zbieżny z kolejnością wątków badawczych przedstawionych w rozdziale Wyniki i zawiera informacje istotne dla zrozumienia dalszych części rozprawy. Kolejne rozdziały Wstępu nie są jednak powiązane myślą przewodnią, a przyczyna zamieszczenia w nich opisu bakterii *Bacillus* spp. i *Halomonas* spp. nie jest dla czytelnika w pełni zrozumiała. O intencji Autorki dowiadujemy się dopiero w końcowej części Wyników rozprawy, gdzie opisano izolację szczepów z obu rodzajów taksonomicznych, występujących w testowanych suplementach diety. Uważam, że z korzyścią dla spójności Wstępu byłoby przeniesienie informacji na temat tych bakterii do Dyskusji rozprawy.

Systemy R-M opisano we Wstępie skrótowo, a niekiedy dość ogólnikowo. Doktorantka, przedstawiając biologiczne znaczenie tych systemów, pisze jedynie, że zapewniają one obronę przed egzogennym DNA wnikającym do komórek bakterii (str. 28). Rzeczywiście aktywność tych systemów może skutkować fragmentacją obcego DNA, jednak z drugiej strony fragmentacja ta

ułatwia wbudowanie powstałych odcinków DNA do genomu w wyniku rekombinacji homologicznej. Ponadto same bakterie determinują aktywny transport egzogennego DNA do wnętrza komórki (transformacja), co sugeruje, że nabywanie DNA jest przez nie wręcz pożądane. Poprosiłbym Doktorantkę o komentarz na ten temat.

Kolejne zdanie przynosi informację, że systemy R-M składają się z dwóch enzymów – endonukleazy i metylotransferazy. Biorąc pod uwagę dużą różnorodność tych systemów, powinniśmy raczej podkreślać nie obecność dwóch enzymów, lecz dwóch aktywności enzymatycznych – dlaczego? W tekście pojawia się również informacja o wyróżnieniu jedenastu podtypów systemów R-M typu II. Poprosiłbym o dopowiedzenie, co było podstawą tej klasyfikacji i czym charakteryzują się poszczególne podtypy. Wspomnę jeszcze, że Schemat 1, wbrew zapowiedzi w tekście (str. 29), nie obrazuje mechanizmu działania endonukleazy, lecz strukturę genetyczną modelowych *loci* R-M.

Kolejne dwa rozdziały **Materiały** oraz **Metody,** obejmują, standardowo, wykaz stosowanych podłoży, odczynników, buforów, enzymów, zestawów komercyjnych, szczepów bakteryjnych, oligonukleotydów, a także opis wykorzystywanych technik mikrobiologicznych, molekularnych i bioinformatycznych. Metodyka została przedstawiona bardzo szczegółowo. Zwrócę jednak uwagę, że w niektórych przypadkach (rozdz. 6.4.1, 6.13.1) kolejne etapy procedury przedstawiono nie w formie opisu, lecz w punkach, co bardziej odpowiada standardom protokołów laboratoryjnych. Ponadto uważam, że umieszczanie w rozprawach szczegółowych informacji na temat warunków trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi oraz składu poszczególnych mieszanin nie jest konieczne, jeśli nie odbiegają one od standardowych. Podobna uwaga dotyczy amplifikacji DNA z wykorzystaniem PCR (Aneks 1). Opisy te zajmują łącznie aż 14 stron rozprawy, a można je przedstawić syntetycznie, w formie dwóch krótkich akapitów tekstu.

Wyniki rozprawy przedstawiono na 38 stronach. Rozpoczyna je krótki rozdział dotyczący izolacji genomowego DNA z 18 szczepów *Arthrospira* spp., które wymieniono w Tabeli 9. To na pozór proste zadanie było dość pracochłonne, bowiem wymagało od Doktorantki optymalizacji zarówno metod hodowli poszczególnych szczepów, jak i metody ekstrakcji, pozwalającej na uzyskanie preparatów DNA o zadowalającej jakości. Następnie odczytano sekwencje nukleotydowe genomów 5 wybranych szczepów, uzyskując, w każdym przypadku, bardzo dużą liczbę skafoldów sekwencji (ang. *draft genome*). Jeden z pięciu wspomnianych szczepów, O9.13 F, nie został ujęty w Tabeli 9 – poprosiłbym o wyjaśnienie.

Ten etap badań przyniósł ogrom danych, ponad 28 mln nukleotydów sekwencji, co pozwala na przeprowadzenie ciekawych analiz *in silico*, również z zakresu genomiki porównawczej. W Tabeli 10. przedstawiono charakterystykę uzyskanych sekwencji, ograniczając się jedynie do podania bardzo ogólnych informacji, dotyczących długości sekwencji, zawartości w nich nukleotydów GC oraz liczby sekwencji kodujących. Nie przedstawiono jednak np. informacji na temat zróżnicowania i liczby grup genów ortologicznych (COG), liczby operonów rRNA, genów unikatowych dla poszczególnych szczepów, liczby i typów kodowanych rekombinaz, czy też charakterystyki sekwencji repetytywnych (innych niż CRIPSR). Zdaję sobie sprawę, że nie jest to głównym wątkiem rozprawy, jednak bardziej szczegółowy opis jest obecnie normą, przy publikacji także niekompletnych sekwencji genomów.

Sekwencje genomowe 13 szczepów *Arthrospira* spp. (w tym pięciu uzyskanych w tej pracy) stanowiły punkt wyjścia do kolejnego etapu badań, którego celem była identyfikacja oraz analiza

dystrybucji w genomach komponentów (i) systemów restrykcji i modyfikacji, (ii) systemów CRIPSR-Cas, (iii) zespołów genów kodujących potencjalnie metabolity wtórne oraz (iv) sekwencji pochodzenia profagowego. Analizy te doprowadziły m.in. do identyfikacji czternastu determinantów genetycznych systemów R-M typu I, dziewięciu kompletnych sekwencji R-M typu II oraz licznych genów towarzyszących zwykle powtórzeniom CRIPSR. Zbadano również korelację między występowaniem tych genów, a przynależnością analizowanych szczepów do poszczególnych grup filogenetycznych *Arthrospira* spp.

W genomach *Arthrospira* spp. zidentyfikowano dość dużą liczbę powtórzeń CRIPSR, a także kilka zgrupowań genów towarzyszących tym *loci*. Co ciekawe, w każdym analizowanym genomie jeden z wykrytych genów, *csx3*, występuje samodzielnie (Schematy 3-15). Czy zdaniem Doktorantki gen ten może być komponentem nowej grupy kaspozonów? Z pewnością wartościowym dopełnieniem charakterystyki CRISPR byłoby również (i) podjęcie próby ustalenia konsensusu sekwencji powtórzonych DR (ang. *direct repeats*), charakterystycznego dla *Arthrospira* spp., oraz (ii) przeprowadzenie analiz porównawczych sekwencji rozdzielających (ang. *spacers*), które stanowią swoistą "pamięć genetyczną" o przebytych infekcjach fagowych oraz zdarzeniach horyzontalnego transferu genów.

W trzech kolejnych rozdziałach Wyników Doktorantka kontynuowała wątek systemów R-M, przeprowadzając: (i) analizę poziomu ekspresji genów R-M typu II oraz *cas* w warunkach stresowych (nie podano w jakim szczepie), (ii) amplifikację genów systemów R-M i CRISPR-Cas, a także (iii) próbę eksperymentalnego potwierdzenia funkcjonalności zidentyfikowanych metylotransferaz w komórkach *Arthrospira* spp. Do każdej z tych części mam pewne uwagi krytyczne.

1) Analiza poziomu ekspresji genów w warunkach stresowych została przeprowadzona w oparciu o dane wyekstrahowane z analiz transkryptomicznych przeprowadzonych przez innych badaczy (Badri i wsp., 2015), co budzi wątpliwość, czy może ona być włączona do Wyników rozprawy. Bakterie podczas badań poddano działaniu bardzo dużych dawek promieniowania gamma (3200 i 5000 Grejów), mogących powodować uszkodzenia komórek. Nie ulega wątpliwości, że w takich warunkach transkryptom ulega diametralnym zmianom, a są to zmiany nie tylko o charakterze adaptacyjnym. W rozprawie przedstawiono wybiórczo dane na temat ekspresji genów systemów R-M i *cas*, nie odnosząc się jednak do globalnych zmian transkryptomu. Zaobserwowano, co prawda, pewne różnice w ekspresji analizowanych genów, jednak nie można doszukać się tu żadnych prawidłowości. Doktorantka wspomina, że promieniowanie gamma imituje warunki panujące w kosmosie. Dla biologa bardziej zasadne wydaje się zbadanie odpowiedzi bakterii na takie warunki stresowe, jakie napotyka ona w naturalnym środowisku bytowania.

2) Doktorantka przeprowadziła amplifikację genów systemów R-M i CRIPSR-Cas celem potwierdzenia ich obecności w zsekwencjonowanych genomach *Arthrospira* spp. (informację o tym, które szczepy poddano analizie czytelnik odnajduje dopiero w podpisie Fotografii zamieszczonych w Aneksie 2). Poprosiłbym o uzasadnienie, dlaczego wyniki sekwencjonowania wymagały potwierdzenia metodą PCR? Zwykle kierunek działań jest odwrotny, poprzez sekwencjonowanie DNA weryfikujemy specyficzność przeprowadzonej wcześniej amplifikacji PCR. Uważam, że znacznie więcej informacji na temat dystrybucji analizowanych genów w rodzaju *Arthrospira* można byłoby uzyskać, analizując szczepy, których genomy nie zostały dotąd zsekwencjonowane. Doktorantka dysponowała genomowym DNA takich szczepów (Tabela 9), który mógł posłużyć, jako matrycowy w reakcjach amplifikacji.

3) W kolejnej części podjęto próbę potwierdzenia funkcjonalności metylotransferaz kodowanych w genomach *Arthrospira* spp. Do tego celu wykorzystano dostępne komercyjnie enzymy restrykcyjne, będące izoschizomerami endonukleaz analizowanych systemów R-M. Brak trawienia genomowego DNA danym enzymem interpretowano protekcyjnym działaniem funkcjonalnej metylotransferazy. Doktorantka stwierdza, że nie zaobserwowała cięcia DNA żadnym enzymem, stąd wniosek o aktywności metylotransferaz. Przedstawione w rozprawie Fotografie ilustrujące wyniki tych analiz są bardzo słabej jakości (Aneks 2), co utrudnia, bądź uniemożliwia (Fotografia 20) ich analizę. Nie mniej jednak, w przypadku niemal każdej próby obraz elektroforegramu interpretowałbym jako pozytywny wynik trawienia DNA. Poprosiłbym Doktorantkę o ponowną krytyczną analizę tych wyników i przedstawienie wniosków podczas obrony rozprawy.

Drugi, odrębny wątek ocenianej rozprawy dotyczy analizy jakościowej komercyjnie dostępnych preparatów zawierających suchą biomasę *Arthrospira* spp. W kolejnych rozdziałach Doktorantka (i) identyfikuje warianty filogenetyczne *Arthrospira* spp., (ii) bada czystość mikrobiologiczną preparatów, (iii) sprawdza obecność środków konserwujących, (iv) identyfikuje potencjalne bakterie symbiotyczne, (v) bada także właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne preparatów. Uzyskane wyniki przynoszą kilka ciekawych obserwacji, które można odnieść również do innych suplementów diety, znajdujących się w sprzedaży.

Lekturę niektórych podrozdziałów rozprawy utrudnia brak dokładniejszych opisów, co zmusza do poszukiwania podstawowych informacji w innych częściach pracy.

Dyskusja stanowi mocną stronę rozprawy. Scala ona różne wątki tematyczne pracy i dowodzi dużej wiedzy Doktorantki na temat bakterii *Arthrospira* spp. Została ona przeprowadzona na tle bogatego zestawu literatury (zacytowano łącznie 164 prace). Załączony w rozdziale **Bibliografia** spis cytowanych pozycji obejmuje istotne, prawidłowo dobrane publikacje naukowe, z uwzględnieniem najnowszych prac z omawianej dziedziny.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na liczne potknięcia edycyjne i językowe. Niżej podaje jedynie kilka przykładów, a pozostałe zaznaczyłem w otrzymanym egzemplarzu pracy doktorskiej. Bardzo liczne są błędy interpunkcyjne oraz językowe (np. "wachać" zamiast "wahać", str. 32; "wiele producentów" zamiast "wielu producentów", str. 36; "wiązanie do DNA" zamiast "wiązanie z DNA", str. 29; "sonifikacja" zamiast "sonikacja", str. 117; "metylazy" zamiast "metylotransferazy", str. 81. Mam również pewne zastrzeżenia dotyczące używania zapożyczeń z języka angielskiego np. "assembling sekwencji" zamiast "składanie sekwencji", "sekwencje spacerowe" zamiast "sekwencje rozdzielające", str. 32), a także uproszczeń w formułowaiu tytułów niektórych rozdziałów (np. "Rodzaj *Bacillus* i jego zastosowanie" zamiast "Bakterie z rodzaju *Bacillus* i ich zastosowanie" str. 37, czy też "Analiza *in silico* genomów *Arthrospira*" zamiast "Analiza *in silico* sekwencji nukleotydowych genomów *Arthrospira* spp.", str. 80). W pracy nie znajduję źródeł zamieszczonych fotografii, brakuje też odwołań do pozycji bibliograficznych, w których opisano po raz pierwszy stosowane podłoża mikrobiologiczne. Zauważyłem również brak opisu ścieżek 12 i 13 w legendach do Fotografii 7-17, brak numeracji ścieżek na Fotografii 15, a także brak widocznej pozytywnej kontroli reakcji amplifikacji PCR na Fotografii 17 (ścieżka 10). W tym miejscu dodam, że nie uważam za zasadne różnicowanie ilustracji na ryciny, schematy, fotografie i wykresy. Wszystkie te ilustracje powinny być nazwane rycinami, a jednolita numeracja ułatwiłaby odszukanie poszczególnych rycin w obszernej rozprawie. Ponadto, chciałbym zwrócić uwagę, że (i) nazwy enzymów restrykcyjnych nie powinny być pisane kursywą, (ii) przy wielokrotnym podawaniu w tekście nazwy gatunkowej danej bakterii, należy konsekwentnie

stosować skróty nazw rodzajowych, (iii) a po tytule rozdziałów nie powinno się stawiać kropek. Inne moje uwagi chętnie przekażę Doktorantce.

Uwagi te nie rzutują na moją pozytywną ocenę całości recenzowanej rozprawy. Zdaję sobie sprawę, że niektóre zamieszone w recenzji uwagi są subiektywne bądź dyskusyjne, uważam jednak, że recenzja do takiej dyskusji powinna skłaniać. Przeprowadzone badania niewątpliwie wniosły nowe informacje do ogólnej wiedzy na temat bakterii z rodzaju *Arthrospira*. Za najważniejsze osiągnięcia tej rozprawy uważam:

1) odczytanie i udostępnienie w bazach danych sekwencji nukleotydowych 5 genomów *Arthrospira* spp. Niemal o 40 % wzbogacono liczbę poznanych genomów tych bakterii. Co ważne, analizowane szczepy pochodziły z różnych siedlisk, z różnych lokalizacji geograficznych, co jest istotne dla rozważań na temat zmienności genetycznej całego rodzaju taksonomicznego,

2) identyfikacja puli genów systemów R-M i CRISPR-Cas zachowanych ewolucyjnie w genomach *Arthrospira* spp., co stanowi doskonały punkt wyjścia do analizy biologicznej roli tych systemów,

3) uzyskanie danych potwierdzających dychotomię rodzaju *Arthrospira* i sugerujących występowanie jedynie dwóch gatunków w tym rodzaju taksonomicznym,

4) analizę komercyjnie dostępnych preparatów zawierających suchą biomasę *Arthrospira* oraz wnioski na temat wpływu procesu produkcyjnego na właściwości tych preparatów – według mojej wiedzy są to pierwsze tego typu opracowania porównawcze,

5) stwierdzenie, że bakterie stanowiące składnik konsorcjum *Arthrospira* spp. mogą odpowiadać za właściwości prozdrowotne i ochronne przypisywane komórkom *Arthrospira* spp., co jest ciekawą sugestią.

Należy również podkreślić, że Pani mgr Magda Furmaniak jest pierwszym autorem ciekawej pracy przeglądowej na temat bakterii z rodzaju *Arthrospira*, która została opublikowana w ubiegłym roku, w cenionym przez mikrobiologów czasopiśmie *Frontiers in Microbiology* (IF 4,0). Potwierdza to wiedzę ekspercka Doktorantki w obrębie poruszanej tematyki badawczej.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, sprecyzowane w ustawie o Tytule i Stopniach Naukowych, a dorobek naukowy Kandydatki uzasadnia nadanie Jej stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych. Wnoszę więc do Rady Naukowej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Magdy Furmaniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Dariusz Bartosik

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl